

The effect of aerobic training on Klotho protein and a selected of inflammatory indices in kidney of Male Rats

Akbar Moein, Hojatollah Nikbakht*, Farshad Ghazalian

Physiology Department of Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

(Received: 2017/04/3 Accept: 2017/08/8)

Abstract

Background: Considering the importance of the Klotho gene and cytokine proteins and the existence of some research on the effect of exercise on these proteins, the present study was carried out to examine the effect of aerobic training on Klotho protein, interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha inflammatory factors in rats.

Materials and Methods: For this purpose 12 male rats with an average weight $170g \pm 5g$ and the age of eight weeks were divided into two groups: control ($N=6$) and experimental ($N=6$) groups. The experimental groups trained on a treadmill for 8 weeks and 3 sessions per week. 48 h after the last training session, both groups of rats were slaughtered ethically and kidney tissue was extracted. Klotho, IL-6 and TNF- α proteins of kidney tissues were measured and counted using by the western blot method.

Findings: The Klotho protein ($P=0.05$) significantly increased in training rats compared with the control group. Also the IL-6 protein ($P=0.05$) significantly decreased in training rats compared with the control group. While the TNF- α protein ($P=0.42$) did not show a significant difference.

Conclusion: Aerobic training might increase the Klotho protein, on the other hand can also decrease the levels of IL-6 protein secreted by the kidney. So it can be said that probably aerobic training may delay aging symptoms and may decrease in inflammatory responses.

Keywords: Aerobic training, Klotho, TNF- α , IL6

*Corresponding author: Hojatollah Nikbakht
Email: hojnik1937@yahoo.com

اثر هشت هفته تمرين هوائي بر پروتئين کلوتو و منتخبی از شاخصهای التهابی بافت کلیه در موشهای صحرایی نر

اکبر معین، حجت الله نیکبخت*، فرشاد غزالیان

واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۵/۱۷

چکیده:

سابقه و هدف: با توجه به اهمیت زن کلوتو و پروتئین‌های سایتوکاین و وجود بعضی تحقیقات مبنی بر تأثیر ورزش بر آنها، تحقیق حاضر به منظور تعیین اثر یک دوره تمرين هوائي بر پروتئین کلوتو و عوامل التهابی ایترولوکین ۶ و عامل نکروز تومور آلفا در موشهای صحرایی نر انجام شد.

مواد و روش بروزرسانی: تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. برای این منظور ۱۲ سر موش صحرایی نر با میانگین وزن 250 ± 9 گرم و سن ۱ هفته انتخاب و به دو گروه کنترل ($N=6$) و آزمایشی ($N=6$) تقسیم شدند. گروه آزمایشی به مدت ۱ هفته و ۳ جلسه در هفته به تمرين هوائي روی تردیمیل پرداختند. ساعت پس از آخرین جلسه تمرين، موشهای هر دو گروه به روش اخلاقی کشтар و بافت کلیه آنها استخراج شد. سپس پروتئین‌های کلوتو، IL-6 و TNF- α بافت کلیه به روش وسترن بلات اندازه گیری و شمارش شدند.

یافته‌ها: پروتئین کلوتو ($P < 0.05$) در گروه موش‌های تمرين کرده افزایش معناداری نسبت به گروه کنترل نشان داد. پروتئین IL-6 ($P < 0.05$) نیز در گروه موشهای تمرين کرده کاهش معنی داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. این در حالی بود که مقادیر پروتئین TNF- α اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0.42$).

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که تمرين هوائي می‌تواند موجب افزایش پروتئین کلوتو گردد، از سویی می‌تواند از میزان IL-6 ترشحی بافت کلیه نیز بکاهد. بنابراین می‌توان گفت احتمالاً تمرين هوائي می‌تواند علائم کهنسالی را به تأخیر انداخته و واکنش التهابی را کاهش دهد.

واژگان کلیدی: تمرين هوائي، کلوتو، ایترولوکین ۶، عامل نکروز تومور آلفا

* نویسنده مسئول: حجت الله نیکبخت

پست الکترونیک: hojnik1937@yahoo.com

مقدمه:

سطوح mRNA و پروتئین به میزان زیادی در کلیه بیماران مبتلا به نقص مزمن کلیوی کاهش می‌یابد، و تجمع کلوتو در مایع مغزی نخاعی در بزرگسالان پیر مبتلا به آزادیم نسبت به افراد همسن با عملکرد شناختی طبیعی کمتر است. در مجموع، این اطلاعات نشان می‌دهد کاهش کلوتو مرتبط با سن ممکن است در پیشرفت اختلال مغزی و کلیوی مرتبط با پیری از راه القاء فشار اکسایشی و التهاب در محور کلیوی مغزی درگیر باشد (۵).

با توجه به اینکه تحقیقات مختلف آثار تأخیری کلوتو بر پیری و همچنین ارتباط آن با التهاب را گزارش کرده‌اند، و از سویی فعالیت‌های ورزشی نیز با عوامل التهابی ارتباطی دوسویه دارند، بررسی تأثیر فعالیت ورزشی بر پروتئین کلوتو از جنبه آثار پیشگیری کننده آن بر روند کهنسالی و همچنین بررسی ارتباط فعالیت ورزشی، کلوتو و عوامل التهابی هدف پژوهش حاضر می‌باشد.

مواد و روشها:

تحقیق به روش تجربی انجام گرفت. تعداد ۱۲ سر موش صحرایی نر ۸ هفته‌ای با میانگین وزن ۲۵۰ ± ۹ گرم هفته از مرکز علوم حیوانات آزمایشگاهی انتستیتو پاستور ایران، کرج تهیه شدند و پس از انتقال به محیط آزمایشگاه و آشنایی با محیط جدید و نحوه فعالیت روی نوارگردان مورد آزمون قرار گرفتند.

موش‌های مورد آزمایش در این پژوهش در دوره‌ی ۸ هفته‌ای، به صورت انفرادی در قفس‌های پلی کربنات شفاف $۱۵\times ۱۵\times ۲۰$ سانتی متر و در محیطی با دمای ۲۲ ± ۲ درجه‌ی سانتی گراد و چرخه‌ی روشنایی به تاریکی ۱۲ ± ۱ ساعت و رطوبت ۵۰ ± ۵ درصد نگهداری شدند.

تجذیه موش‌های صحرایی به صورت پلت که حاوی ترکیب مشخصی از انواع مواد مغذی مورد نیاز حیوان است، انجام شد. غذای آزمودنی‌های این پژوهش، بر اساس وزن کشی هفتگی با ترازوی استاندارد ویژه و با توجه به جیره‌ی طبیعی ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در روز، غذا در هر قفس گذاشته شد. در همه‌ی مراحل پژوهش، آب مورد نیاز هر حیوان به صورت آزاد در بطری ویژه حیوانات آزمایشگاهی در اختیار آنها قرار داده شد (۷).

قبل از اجرای پروتکل تمرینی، ابتدا تمرینات آشناسازی گروه تمرین هوایی شامل راه رفتن و دویدن روی نوارگردان مخصوص حیوانات آزمایشگاهی (ساخت شرکت پیشرو اندیشه صنعت- مدل آذرخش)، با سرعت ۱۶ متر در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه یا تا هنگام رسیدن به سطح پایدار اکسیژن مصرفی انجام پذیرفت (۸).

پس از آشناسازی موش‌ها با دویدن روی نوارگردان، برنامه تمرینات هوایی شروع شد. تمرین هوایی فراینده (دویدن روی نوارگردان) به مدت ۸ هفته و هفته‌ای ۳ جلسه ۲۷ الی ۳۲ دقیقه و با شدت ۶۰ تا ۸۰ درصد حجم اکسیژن مصرفی بیشینه ($\text{VO}_{2\text{max}}$) (سرعت ۸ تا ۲۵ متر در دقیقه) و بدون شب انجام شد (۹). تمرینات هر جلسه شامل سه دقیقه گرم کردن با سرعت ۸ متر در دقیقه بود و سپس سه دقیقه دویدن با سرعت ۱۶ متر بر

کلوتو ژنی است که با ساخت پروتئین همانم، کارکردهای مختلفی را به عهده دارد. این ژن در سال ۱۹۹۷ به صورت تصادفی توسط کورو و همکاران اوی کشف و به نام الهه عمر در یونان باستان نام‌گذاری شد. حذف این ژن در موش‌ها، باعث ایجاد تظاهرات مشابه فرایند افزایش سن مانند کلسيفيکاسيون عروق و تغييرات متabolism کلسيم-سففات و همچنین کاهش طول زندگی آنها شد. در پژوهش‌های مختلف صورت گرفته بر روی اين پروتئين، کاهش آن در موارد زير مشخص شده است: افزایش سن، ديبات، بيماري پروفشاري خون، نارسيابي مزمن کليوی، ايسكمي کلية و بيماري گلوموفوريت (۱).

سايتوكاين‌ها نيز يك ديجر از عوامل مؤثر در پيری می‌باشند. سايتوكاين‌ها گروهی از پروتئین‌ها هستند که نقش اصلی را در پاسخ‌های التهابی به محرك‌های پاتولوژيك مانند التهاب و آسيب بافتی ايفا می‌کنند. تولید سايتوكاين‌ها به وسیله‌ی دامنه‌ای از محرك‌های فيزيولوژيك مانند ورزش تنظيم می‌شود. سايتوكاين‌های مانند اينتلوكین ۶ (IL-6)، عامل نکروز کننده توموري (TNF- α) و اينتلوكین ۱۵ به هنگام ورزش بيشترین اثر را بر توده‌ی عضلانی دارد (۲).

از سویی يك رابطه‌ی دو طرفه بین کلوتو و التهاب وجود دارد. التهاب سیستمیک و موضعی (هر دو) می‌تواند بیان ژن کلوتوی کلیه را کاهش دهد. بنابراین بیان ژن کلوتوی کلیه در استرس التهابی حاد با واسطه‌ی لیبوپلی‌اسکارايد به طور منفی تنظیم می‌شود (۳). کلوتوی کلیه در موش‌ها، با اشكال مختلف بیماری التهابی روده و عامل نکروز توموري آلفا سرکوب و مهار می‌گردد. علاوه بر این کلوتوی کلیه، در آسيب‌های کلیوی حاد و مزمن از راه التهاب کلیوی کاهش می‌یابد. ايسكمي ناشی از آسيب کلیوی و آلومینوري نيز باعث کاهش میزان کلوتو در پلاسمما و ادرار می‌گردد (۴). همچنین، به تازگی القاء کننده ضعيف آپوتوزی شبه (TWEAK TNF) به عنوان يك ميانجي التهابي توبولي کلیوی از راه تعامل با گيرنده Fn14 (Fibroblast growth factor-inducible 14) شناخته شده است. در طی آسيب کلیوی TWEAK ممکن است نقش افزوده‌ای شامل Chemokine CCL2 (Chemokine ligand 21 (C-C motif) ligand 21 TNF و TWAEK (هر دو) می‌توانند آسيب سلولی توبولي و نکروز را افزایش دهند. به علاوه TNF و TWEAK ميانجي‌های التهابی و آتروواسکلورز هستند که يكی از عوامل کلیدی در بیماران مبتلا به CKD می‌باشد، و میزان بالایی از مرگ و میر را به همراه دارد (۴).

تحقیقات اخیر نگرش جدیدی نسبت به تغییرات پاتوفیزیولوژی در محور مغز-کلیه در فرایند کهنسالی با نقش حیاتی فشار اکسایشی و التهاب مرتبط با کهنسالی فراهم کرده است. بسیاری از پژوهشگران پیشنهاد کرده‌اند اثر ضد پیری پروتئین کلوتو با عملکرد ضد اکسایشی آن، از راه افزایش بیان عوامل FOXO و عامل هسته‌ای ارتیروئید ۲ مرتبط با فاکتور ۲ و اثر ضد التهابی آن از راه ممانعت فعالیت عامل التهابی RIG-I NFkB به واسطه AP-1 مرتبط است. نتایج کارآزمایی بالینی نشان داد بیان کلوتو در

جدول ۱. پرتوکل تمرین هوایی.

کلیه محاسبات به کمک رایانه و با استفاده از نرم افزار 16 SPSS انجام گرفت.

یافته‌ها:

تعداد ۱۲ نمونه و در هر گروه ۶ نمونه انجام گرفت. میزان شاخص‌ها بر حسب گروه‌ها در جدول شماره یک ارائه گردیده است و نشان می‌دهد که به دنبال ۸ هفته تمرین هوایی، پروتئین کلوتو در موش‌های تمرین کرده افزایش معناداری ($P<0.05$) دارد، در حالی که تغییر معناداری در پروتئین در گروه کنترل مشاهده نگردید. همچنین کاهش معناداری در پروتئین IL-6 ($P<0.05$) در موش‌های تمرین کرده در مقایسه با گروه کنترل مشاهده شد. این در حالی بود که در مقایسه با گروه کنترل، پروتئین TNF- α در گروه تمرین کرده اختلاف معناداری نداشت. میزان همبستگی معناداری نیز بین سه متغیر وابسته در جدول شماره ۳ ارائه شده است. مشاهده نشد.

بحث:

این تحقیق افزایش معنی‌داری در پروتئین کلوتو و کاهش معنی‌دار پروتئین IL-6 و عدم تفاوت مقادیر پروتئینی TNF- α را نشان داد. از سویی بین تغییرات پروتئین کلوتو و عوامل التهابی نیز همبستگی معناداری مشاهده نشد.

نتایج تحقیق حاضر در خصوص تغییرات پروتئین کلوتو با بیشتر یافته‌های قبلی هم‌خوانی داشت (۱۱، ۱۳-۱۶، ۱۷، ۱۹ و ۲۱ و ۳۹) ولی ساز و کار این تغییرات هنوز به خوبی روشن نشده است.

در مطالعه‌ای که کلوتوی گردشی در گروه افراد تمرین کرده‌ی مبتلا به CAD (Coronary artery disease) در برابر مبتلایان به تمرين نکرده و همتایان سالم خود، به طور معناداری بیشتر بود (۳۹). در تحقیق دیگری نیز مستندی و همکاران (۲۰۱۶) بر روی وزشکاران جوان فوتولیست انجام دادند، افزایش معنادار پروتئین کلوتو سرمی را در افراد وزشکار در مقایسه با افراد سالم غیر وزشکار مشاهده نمودند (۱۱).

در تحقیق دیگری سمبا و همکاران (۲۰۱۲) آزمون ۶۵ سال به بالا مورد آزمون قرار گرفتند و افراد با کلوتوی پلاسمای کمتر دارای قدرت مج کمتری بودند. این یافته‌ها با سارکوپنی که در مدل موشهای کلوتو مشاهده شد همخوانی دارد. اگرچه نمی‌توان کلوتوی پلاسما را به عنوان یک عامل پیش بین مستقل در مورد کاهش قدرت دانست ولیکن یک رقیب قوی خطر مرگ و میر می‌باشد. مشارکت کنندگان با غلظت پائین کلوتو در معرض خطر مرگ و میر بالاتری بودند (۱۷).

تحقیق حاضر با تحقیق کراستو و همکاران (۲۰۱۱) نیز هم‌خوانی داشت که طی آن مشاهده گردید مقادیر کلوتو پلاسما در افراد سالخورده با شیوع ناتوانی در فعالیتهای روزانه ارتباط معکوس و معناداری دارد (۱۳). مکانیسم احتمالی که کلوتو می‌تواند بر خطر ناتوانی اثرگذار باشد، اثر فقدان کلوتو بر عضله اسکلتی است. موشهای ترانسژنیک قادر نیست کلوتو به طور شاخصی آتروفی عضلانی را نشان داده‌اند. قطر میوپیرها در موشهای کلوتو تا ۳۰ درصد نسبت به موشهای وحشی کمتر بود. در عضلات اسکلتی مقادیر TNF- α و IL-6 نیز از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

درصد شیب (دقیقه)	مدت (دقیقه)	سرعت (متر بر دقیقه)	هفته
صفرا	۱۰	۱۰	اول
صفرا	۱۵	۱۲	دوم
صفرا	۲۰	۱۴	سوم
صفرا	۲۵	۱۶	چهارم
صفرا	۳۰	۱۸	پنجم
صفرا	۳۵	۲۰	ششم
صفرا	۴۰	۲۲	هفتم
صفرا	۴۵	۲۴-۲۵	هشتم

دقیقه، و در ادامه هر دقیقه دو متر به سرعت اضافه گردید تا به فلات برسد و در طول ۸ هفته نیز به تدریج سرعت و مدت زمان دویدن موش‌ها روی نوارگردان اضافه گردید تا به سقف ۲۵ متر در دقیقه برسند. در انتهای هر جلسه تمرینی، پس از سرد کردن، موش‌ها از روی نوارگردان برداشته شدند (۸).

موش‌های صحرایی ۴۸ ساعت پس از اتمام آخرین جلسه تمرین، در حالی که سیر بودند (۴ ساعت قبل از کشته شدن غذا از قفس برداشته، اما به آب دستریسی داشتند) با تزریق داخل صفاقی ترکیبی از ماده بیهوشی کتابیمین (۳۰-۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و زیالازین (۳-۵) میلی- گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش و کشته شدند و بافت کلیه آنها پس از انجماد سریع به کم نیتروژن مایع، در دمای ۵-۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. عصاره‌ی پروتئین از بافت کلیه موش به سیلولیه هموژنایزر مکانیکی در بافر Tris-HCL 100Mm NaCL 300Mm SDS 2% NPHO 2% و دئوکسی کولین اسید (۰.۱٪) با کوکتل مهار کننده پروتئاز NAVO2 2Mm و NaF 10Mm (SDS-PAGE) انجام پذیرفت. عصاره‌ی پروتئین‌ها با تکنیک الکتروفورز (ZL)، پلی آکریلامید-سدیم دو دسیل سولفات (Bio Rad) نیز برای تعیین غلظت پروتئین‌ها به کار رفت (۱۰).

از آزمون کولموگروف اسپیرنوف برای تعیین طبیعی بودن توزیع داده‌ها استفاده گردید. همچنین بر اساس نتایج حاصل و با توجه به پارامتریک بودن داده‌ها از آزمون تی مستقل به منظور مقایسه میزان پروتئینهای کلوتو، IL-6 و TNF- α در موش‌های تمرین کرده استقامتی و موش‌های گروه کنترل استفاده شد. به منظور بررسی همبستگی میان تغییرات پروتئین کلوتو با پروتئینهای IL-6 و TNF- α نیز از ضریب همبستگی پیرسون استفاده شد.

جدول ۳. میزان همبستگی میان متغیرهای کلتو، TNF- α و IL-6.

TNF- α	IL-6	کلتو	متغیر
-۰.۵۰۲	-۰.۰۳۶	۱	کلتو
۱	۰.۵۶۷	-۰.۵۰۲	TNF- α
۰.۵۶۷	۱	-۰.۰۳۶	IL-6

واکنش شده و باعث کاهش میل ترکیبی لیگاند درونزای TGF- β 1 می‌گردد (۲۲).

بیشتر تحقیقات بیان‌گر آن است که تمرينات استقامتی منجر به افزایش TGF- β 1 به ویژه در عضلات اسکلتی و قلبی می‌گردد (۱۸) لذا افزایش هم‌زمان TGF- β 1 و پروتئین کلتو به دنبال تمرينات استقامتی از سویی و اثر بازدارنده کلتو بر پیامرسانی TGF- β 1 از سویی دیگر با یکدیگر متناقض بوده و نیازمند بررسی بیشتر اثر این دو بر یکدیگر می‌باشد.

همچنین نشان داده شده است کلتو به طور مستقیم به اعضای مختلف خانواده Wnt در سلولهای روده کوچک و فولیکولهای موی موشها متصصل و مانع فعالیت آنها می‌شود (۲۰). پروتئینهای خانواده Wnt همانند TGF- β 1 در افزایش فیبروز عضلانی ناشی از کهنسالی نقش دارند (۲۱). کلتو با هدف قرار دادن مسیرهای پیامرسانی Wnt و TGF- β 1 قادر به کاهش فیبروز کلیوی پس از انسداد حالب (پیشابرایه) می‌باشد (۲۲) و به عنوان یک درمان پیشنهادی برای کاهش فیبروز طی بیماری مزمن کلیوی مطرح شده است (۲۵) با تعمیم اثر آنتی فیبروتیک کلتو به بافت عضلانی، پروتئین کلتو به عنوان یک کاندیدای جالب توجه برای کاهش توده عضلانی وابسته به سن مطرح می‌گردد (۲۱).

تحقیق ماتسوبارا و همکاران (۲۰۱۴) نیز در خصوص تاثیر تمرينات هوایی بر سطوح کلتو پلاسمما و سختی شریانی، نتایجی مشابه با تحقیق حاضر را به همراه داشت. به دنبال یک دوره تمرين هوایی در زنان یائسه ۵۰ تا ۷۶ ساله مقادیر کلتو پلاسمما افزایش و سختی شریانی به عنوان یک عامل خطرزای قلبی عروقی و سالخوردگی کاهش یافت (۲۷). در مoshها کلتو ترشحی از کلیه، مانع پیامرسانی TGF- β 1 می‌شود که فشار اکسایشی و بازارائی را القاء می‌کند. بنابراین این یافته‌ها نشان می‌دهد که کلتو به عنوان یک عامل هورمونی که حفاظت عروقی را افزایش می‌دهد، عمل می‌کند. گزارش شده است که اختلال عملکرد در التهاب، فشار اکسایشی عروقی، کلسیفیه شدن عروقی و بازارائی ناشی از سختی شریانی، افزایش عروقی، همچنین نشان داده شده است CKD منجر به کاهش مقادیر کلتو گردشی و افزایش غلظت کلتو پلاسمما و سختی شریانی می‌گردد. در مطالعات مقطعی همبستگی بین مقادیر غلظت کلتو پلاسمما و سختی شریانی مشاهده شده است. در مجموع این یافته‌ها نشان می‌دهد که کلتوی درون‌زا ممکن است از طریق

جدول ۲. نتایج آنالیز آماری به روش تی همسنده مریوط به متغیرهای تحقیق.

TNF- α	IL6	کلتو	گروهها شاخصها
۱.۰۰۰±۰..	۱.۰۰۰±۰..	۱.۰۰۰±۰..	کنترل (N1=6)
۰.۹۶۳±۰.۶۲	۰.۴۴۷±۰.۹۸	۰.۷۵۲±۱.۴۶۹	آزمایش (N2=6)

مقادیر پروتئین در موشهای تماریخته (بیانی پیش از حد کلتو)، گونه‌های وحشی و یافته کلتو همبستگی دارد. مطالعات اخیر نشان داده است که در مقایسه با گونه‌های وحشی موش‌ها، مسیر لیزوژومی- اتوفازی در موشهای یافته کلتو فعال‌تر است. در مقایسه با موش‌های گونه وحشی، در عضلات اسکلتی موشهای فاقد کلتو سه برابر بیان بیشتر گیرنده پروتئین ۷-آمینو بوتیرات نوع A-پروتئینی که با فعال سازی مسیر اتوفازی (لیزوژومی همراه است) مشاهده شد. سرکوب فشار اکسایشی در عضله اسکلتی از طریق ممانعت مسیر پیامرسانی انسولین-1/IGF-1 و فعال سازی مسیر اتوفازی- لیزوژومی دو مسیر بیولوژیکی هستند که کلتو در پاتوزن سارکوبنی به کار می‌گیرد (۱۴). در مسیر اتوفازی- لیزوژومی، ماکرومولکولهای ارگانلهای در اتوفاگوزوم جذب شده و پس از تغییر در لیزوژوم دچار تجزیه لیزوژومی بعدی می‌گردد. در مسیر یوبی کوئیتین پروتئوزوم، پروتئینها با یوبی کوئیتین‌های چندگانه آمیخته شده و سپس در کمپلکس پروتئوزومی تجزیه می‌شوند. پیامرسانی انسولین-1/IGF هر دو مسیر را از طریق پروتئین کیناز FOXO (Forkhead box O3) تنظیم می‌کند. اعتقاد بر این است که کلتو گردشی پلاسما مسیر پیامرسانی انسولین-1/IGF را تنظیم می‌کند، گرچه ساز و کار بیولوژیک آن باید شناخته شود (۱۴). کلتو همچنین اثر چند بُعدی بر استشپرورز، بیماریهای قلبی عروقی و شناخت دارد (۱۹).

پروتئین ترشحی کلتو به طور مستقیم مانع فعالیت عامل پیش فیبروزی Wnt و مسیر TGF- β 1 در بافت کلیوی می‌گردد (مسیر پیامرسانی Wnt در تعیین سرنوشت سلولی، مهاجرت سلولی، قطبیت سلولی، الگوهای عصبی و اندامزایی در طول دوره جنبی نقش اساسی بر عهده دارد (۲۳) و می‌تواند به طور بالقوه دارای نقش مشابه در بافت عضله باشد. این نقش کلتو را به عنوان تنظیم کننده فیبروز عضلانی در ارتباط با افزایش سن، معرفی می‌نماید. TGF- β 1 نه تنها تنظیم کننده فیبروز بافتی است، بلکه به نظر می‌رسد مانع فعالیت سلول‌های ماهواره‌ای و تمايز سلول‌های میوبلاست باشد. شواهد بیانگر آنست که عضلات مسن حاوی مقادیر بالاتر TGF- β 1 بوده و ممانعت از پیامرسانی TGF- β 1 بازسازی عضلات را افزایش می‌دهد. شکل ترشحی کلتو مستقیماً با گیرنده‌های نوع II TGF- β 1 وارد

تمرین همزمان، تفاوت معنی‌داری در مقدار IL-6، TNF- α و CRP نسبت به گروه کنترل مشاهده نکردند (۳۵). با توجه به اینکه تمرینات هوایی در این تحقیق ۱۶ هفته به طول انجامید، تفاوت در پروتکل تمرینی ممکن است بینگر تفاوت یافته‌ها در این تحقیق با تحقیق حاضر باشد. گرچه این مغایرت در مورد IL-6 دیده شد و نتایج مربوط به TNF- α در دو تحقیق خمخوانی داشت.

مقنسی و همکاران تغییرات ناشی دو نوع تمرین مقاومتی و هوایی را بر برخی از سایتوکاین‌های پیش التهابی شامل ICAM-1، TNF- α و IL-6 در موش‌های صحرایی نر را مورد بررسی قرار دادند و پس از ۲۴ هفته تمرین هوایی کاهش معنی‌داری در هیچ یک از متغیرها مشاهده نکردند. در حالی که پس از ۳۶ هفته تمرین هوایی هر سه متغیر تغییرات کاهشی معنی‌داری را نشان دادند (۳۶).

از سوی دیگر تحقیق حاضر همبستگی معناداری بین تغییرات پروتئین کلتو و عوامل التهابی IL-6 و TNF- α نیافت، که با بیشتر تحقیقات انجام شده در این زمینه مغایر بود. تحقیقاتی که ارتباط معناداری بین این کلتو و عوامل التهابی‌را گزارش کردند، مسیرهای پیام‌رسانی متفاوتی را بررسی نمودند که به برخی از آنها می‌پردازیم.

اخیراً معلوم شده است کلتو، غالباً به واسطهٔ تعديل فشار اکسایشی میتوکندریایی و آپوپتوز، تأثیر حفاظتی بر کلیه دارد. ژاآو و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای کاهش معنادار mRNA و همچنین پروتئین کلتوی کلیه را در موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه‌های کنترل بر اساس جنس و سن نشان دادند که با گزارش‌های اخیر در مورد کاهش مشابه کلتوی کلیه موش‌های دیابتی شده با القاء استرپتوزوتوكسین هم‌خوانی داشت. همچنین، کاهش کلتو به دلیل دو رویکرد فارماکولوژیک برای تضعیف شدت هایپرگلایسمی (انسوالین و فلوریزیدین) بر مقدار کلتوی بازسازی شده با هایپرگلایسمی مرتبط است. در این مطالعه نقش جدیدی نیز برای کلتو به عنوان تنظیم کننده عامل هسته‌ای کاپا بی (NF- κ B) در مسیر فعال‌سازی غیر کانونی ویژه شامل فسفوریل‌اسیون (Serine) RelA (Serine) گزارش شد. این نتایج پیشنهاد می‌کند کلتو نه تنها باعث مقاومت نسبت به فشار اکسایشی شود بلکه می‌تواند در برابر فعال‌سازی نابجای مسیر فعال‌سازی NF- κ B نقش محافظتی داشته باشد. به این دلیل موش‌های فاقد کلتو افزایش فتوتیپ کهنسالی را نشان دادند. لذا کلتو علاوه بر ایجاد مقاومت نسبت به فشار اکسایشی، کارکرد ضد التهابی نیز دارد (۳۷). شواهد نشان می‌دهند فعال‌سازی RelA برای سرکوب کلتو، القاء شده توسط TNF- α و TWEAK از راه‌های زیر ضروری است:

گزارش شده است که کلتو ترشحی مانع پیام‌رسانی TGF- β 1 در کلیه می‌شود (۲۲). به علاوه کلتوی مغز، تولید اندوتیلن-1 (ET-1) را افزایش می‌دهد. TGF- β 1 و ET-1 تحت تأثیر فعالیت ورزشی هستند (۳۶). افزایش ناشی از تمرین کلتو، می‌تواند تولید ET-1 و TGF- β 1 را افزایش دهد. به علاوه مطالعات مختلفی پیشنهاد نموده‌اند که ساز و کار مربوط به سختی شریانی ناشی از فعالیت ورزشی به واسطهٔ بهبود عملکرد اندوتیالی، سرکوب فشار اکسایشی و التهاب، تنظیم می‌شود. کلتو تحت تأثیر شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک، هم در رونویسی و هم در سطوح پس از رونویسی

ارتفاع عملکرد اندوتیالی و سرکوب التهاب، فشار اکسایشی، کلسیفه شدن و بازآرایی در تنظیم سختی شریانی مؤثر باشد (۲۷).

بررسی در مورد تغییرات حاد عوامل التهابی به طور گسترده‌ای انجام شده و قریب به اتفاق این تحقیقات افزایش عوامل التهابی در حین ورزش و بالاصله پس از ورزش را گزارش کردند (۳۵-۲۹) که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر تفاوت‌هایی داشت. همچنین نتایج در خصوص سازگاری‌های مزمن واکنش التهابی ناشی از فعالیت هوایی متفاوت است. به طور مثال، ترتیبیان و همکاران (۱۳۹۰) اثر تمرین هوایی و مکمل مولتی‌ویتامین بر شاخص‌های التهابی بیماری‌های قلبی عروقی را بررسی نمودند. در این تحقیق ۳۰ زن چاق غیر ورزشکار ۳۵ تا ۵۰ ساله در سه گروه کنترل، تمرین هوایی و تمرین هوایی همراه با مصرف مکمل مولتی ویتامین با یکدیگر مقایسه شدند. در پایان دوره تمرین هوایی که ۹ هفته به طول انجامید، مقدار TNF- α در پلاسمای زنان گروه تمرین هوایی به طور معناداری کاهش یافت (۳۱) که با نتایج تحقیق حاضر مغایرت داشت. تفاوت میان آزمودنی‌های تحقیق فوق و همچنین تفاوت در پروتکل تمرینی با تحقیق حاضر از دلایل احتمالی این مغایرت می‌باشد. همچنین در بررسی تأثیر IL-6 و TNF- α بر مدت تمرین هوایی به مدت دو ماه، بر میزان لپتین، IL-6 و TNF- α در ۳۷ داشتجوی مرد غیر ورزشکار (۱۸ نفر گروه چاق و ۱۹ نفر گروه لاغر) مقدار TNF- α در گروه چاق افزایش غیر معنی دار و در گروه لاغر کاهش معنی داری را نشان داد. مقدار IL-6 نیز در کلیه گروه‌ها، بدون تغییرات معنی دار بود (۳۰). به نظر می‌رسد متغیر شاخص توده بدن که بینگر وضعیت افراد از لحاظ تناسب قد و وزن می‌باشد از عوامل تأثیر گذار بر عوامل التهابی باشد. در پژوهشی که توسط عابدی و همکاران (۱۳۹۲) انجام شد اثر ۱۲ هفته تمرین ترکیبی (هوایی - مقاومتی) بر پروتئین و اکشنگر C (CRP) سرمی و IL-6 پلاسما در مردان غیرفعال مورد بررسی قرار گرفت، سطوح CRP و نسبت دور کمر به دور لگن در گروه تمرینی به طور معناداری پایینتر بود، در حالی که سطوح IL-6، شاخص توده بدن و وزن بدون تغییر باقی ماند (۳۳). به نظر می‌رسد با توجه به اینکه آزمودنی‌ها تمرینات هوایی و مقاومتی را به صورت ترکیبی انجام دادند، تمرینات مقاومتی مانع از کاهش سطوح IL-6 پلاسما گردیده است. در مطالعه فیروز سلطانی و همکاران (۱۳۹۲) در مورد تأثیر هشت هفته فعالیت هوایی بر میزان ویسفاتین، IL-6 و TNF- α در موش‌های ماده نژاد اسپر-اکو-کوادولی، پروتئین‌های ویسفاتین و IL-6 به دنبال یک دوره هشت هفته‌ای تمرین هوایی کاهش معناداری داشته و لیکن در مقدار TNF- α تغییر معناداری مشاهده نشد (۳۴) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت و می‌توان آن را به مشابه بودن شدت و مدت تمرین و همچنین استفاده از آزمودنی‌های مشابه در هر دو تحقیق نسبت داد. نکته حائز اهمیت آنکه Yکی از محرك‌های افزایش IL-6 می‌باشد (۳۵)، لذا کاهش مقدار IL-6 علیرغم عدم تغییر در TNF- α بینگر آن است که ساز و کار دیگری در تغییرات IL-6 دخیل بوده که نیازمند بررسی مسیرهای پیام‌رسانی مرتبط با تغییرات این دو پروتئین می‌باشد. لیاردی و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تأثیر سه نوع تمرین استقامتی، مقاومتی و همزن (کانکارن) بر IL-6، TNF- α و CRP در هیچ یک از گروه‌های تمرین مقاومتی، تمرین استقامتی و

می‌گردد. همچنین در این تحقیق مشاهده شد بیان بیش از حد کلوتو تولید TNF- α ناشی از IL-6 را کاهش می‌دهد (۴۰).

بیشتر تحقیقات تغییرات کاهش پروتئین‌های IL-6 و TNF- α ناشی از تمرینات هوایی نشان داده اند که بیانگر سازگاری مثبت نسبت به بروز التهاب در ورزشکاران رشته‌های استقامتی و هوایی می‌باشد، گرچه در مواردی نیز عدم تغییر این پروتئین‌ها مشاهده شده است (۳۱، ۳۰).

لذا با توجه به نتایج تحقیق حاضر و دیگر تحقیقات همسو می‌توان نتیجه گیری نمود که تمرینات هوایی احتمالاً می‌توانند باعث افزایش کلوتو و کاهش عوامل التهابی به ویژه IL-6 می‌گردد.

تشکر و قدردانی:

این مقاله برگرفته از رساله آقای اکبر معین، دانش‌آموخته دکتری تربیت بدنی - فیزیولوژی ورزشی دانشگاه آزاد اسلامی تهران - واحد علوم و تحقیقات است. از جناب آقای دکتر محمدرضا اردلان که ایده نگارش این رساله با راهنمایی ایشان شکل گرفت و سرکار خانم دکتر پوران کریمی که در آنالیز داده‌ها نهایت همکاری را داشتند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع:

1. Maltese, G., Karalliedde, J. The Putative Role of the Anti ageing Protein Klotho in Cardiovascular and Renal Disease, International Journal of Hypertension 2012; Article ID 757469, 5 pages.
2. Agha Alinejad, H., Molanori Shamsi M. Exercise Induced Release of Cytokines From Skeletal Muscle: Emphasis on IL-6. Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism 2010; 12(2): 181-190.
3. Izquierdo M C, Perez-Gomez M V, Sanchez-Nino M D, Sanz A B, Ruiz Andres O, Poveda J, et al. Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. Nephrology Dialysis Transplantation 2012; 27: 6-10.
4. Moreno JA, Izquierdo MC, Maria D. Sanchez-NiNo M D, Alvarez B S, Larrea C L, Et al. The Inflammatory Cytokines TWEAK and TNF α Reduce Renal Klotho Expression through NF κ B. J Am Soc Nephrol 2011; 22(7): 1315–1325.
5. Zeng Y, Wang PH, Zhang M, Du JR. Aging-related renal injury and inflammation are associated with downregulation of Klotho and induction of RIG-I/NF- κ B signaling pathway in senescence-accelerated mice. Aging Clin Exp Res 2016; 28(1): 69-76.
6. Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. Nat Cell Biol 2011; 13(3): 254-262.
7. Choobineh, S., Dabidi Roshan, V. The effect of endurance training on some indices of homeostasis and

قرار می‌گیرد. نشان داده شده است که γ -PPAR (گیرنده فعال تکثیر کننده پراکسیزومی) به عنوان یک عامل رونویسی درگیر در آدیبوژنز، هموستاز گلوکز و التهاب، باعث افزایش mRNA کلوتو و بیان پروتئین کلوتو می‌گردد. آنزیوتانسین II باعث کاهش مقادیر mRNA کلوتو و بیان پروتئین کلوتو در کلیه می‌گردد و مسدود نمودن گیرنده نوع I آنزیوتانسین (AT1R) II کلوتو گردشی در انسان را افزایش می‌دهد. فشار اکسایشی نیز مقادیر mRNA کلوتو و بیان پروتئین را در لوبلهای کلیه موش کاهش می-دهد و رادیکالهای روبنده (scavenger) باعث افزایش mRNA کلوتو و بیان پروتئین کلوتو می‌شود. به علاوه مطالعات قبلی، پیشنهاد نموده‌اند که فعالیتهای ورزشی γ -PPAR را افزایش داده و فشار اکسایشی را کاهش می‌دهند. بنابراین فعالیتهای ورزشی ممکن است کلوتو را از طریق افزایش AT1R و کاهش AT1R افزایش دهد (۳۴). از سوی دیگر کلوتو با سرکوب RIG-I میانجی فعال سازی IL-6 و NFkB است، بر التهاب ناشی از تأثیر می‌گذارد (۳۸). در تحقیق دیگری که توسط ژیا و همکاران (pravastatin) که به عنوان یکی از انجام شده نشان داده شد پراواستاتین (pravastatin) کاهش خطر بیماری‌های عروقی داروهای کاهش دهنده کلسترول برای انسانی استفاده می‌شود، باعث افزایش بیان کلوتو در اندوتیال و ریبد انسانی HUVECs و از سوی دیگر کاهش بیان IL-6 در

- blood lipids in elderly female rats. Research on Sport Science 2009; 22: 29-43. (Full text in Persian).
8. Gleeson, T., Baldwin, K M. Cardiovascular response to treadmill exercise in untrained rats. J. Appl. Physiol 1981; 50: 1206–1211.
 9. Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. Nat Cell Biol 2011;13(3): 254-262.
 10. Faramoushi M, Amir Sasan R, Sari Sarraf V, Karimi P. Cardiac fibrosis and down regulation of GLUT4 in experimental diabetic cardiomyopathy are ameliorated by chronic exposures to intermittent altitude. Journal of Cardiovascular and Thoracic Research 2016; 8(1): 26-33.
 11. Mostafidi, E, Moeen A, Nasri H, Ghorbani Hagjo A, Ardalan M. Serum Klotho Levels in Trained Athletes. Nephro-Urology Monthly. 2016 8(1), e 30245.
 12. Foster PP., Rosenblatt KP., Kuljiš RO. Exercise-Induced Cognitive Plasticity, Implications for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's disease. Frontiers in Neurology 2011; 2:28.
 13. CRASTO CL, SEMBA RD, SUN K, CAPPOLA, AR, Bandinelli S, Ferrucci L. Relationship of low-circulating "anti-aging" klotho hormone with disability in activities of daily living among older community-dwelling adults. Rejuvenation research 2012; 15: 295-301.
 14. YAMAMOTO, M., CLARK, J. D, PASTOR, J. V, GURNANI, P., NANDI, A., KUROSU, H., et al. Regulation of oxidative stress by the anti-aging

hormone klotho. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 38029-38034.

15. Hsieh C-C, Kuro-o M, Rosenblatt KP, Brobey R, Papaconstantinou J. The ASK1-Signalosome regulates p38 MAPK activity in response to levels of endogenous oxidative stress in the Klotho mouse models of aging. *Aging (Albany NY)* 2010; 2(9): 597-611.

16. Reynolds K, Brobey R K, German D, Sonsalla P K, Gurnani P, Pastor J, et al. Klotho Protects Dopaminergic Neuron Oxidant-Induced Degeneration by Modulating ASK1 and p38 MAPK Signaling Pathways. *PLOS ONE* 2015; 10(10): e0139914.

17. Semba RD, Cappola AR, Sun K, Bandinelli S, Dalal M, Crasto C, et al. Relationship of low plasma klotho with poor grip strength in older community-dwelling adults: the In Chianti study. *European journal of applied physiology* 2012; 112(4): 1215-1220.

18. KURO-O M, Phosphate and klotho. *Kidney International* 2011; 79: S20-S23.

19. Semba RD, Cappola A R, Sun K, Bandinelli, S, Dalal M, Crasto C, et al. Plasma klotho and cardiovascular disease in adults. *Journal of the American Geriatrics Society* 2011; 59(9): 1596-1601.

20. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* 2008; 4(2): 68-75.

21. Phelps M, Pettan-Brewer, C, Ladiges, W, Yablonka-Reuveni, Z. Decline in muscle strength and running endurance in klotho deficient C57BL/6 mice. *Biogerontology* 2013; 14(6): 9447-9452.

22. Czarkowska B, Zendzian M, Bartlomiejczyk I, Przybylski J, Gorski J. The effect of acute and prolonged endurance exercise on transforming growth factor-beta1 generation in rat skeletal and heart muscle. *J physiol pharmacol* 2007; 60(4): 157-162.

23. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 2006; 119: 395-402.

24. Andrew S. Brack, Michael J. Conboy, Sudeep Roy, Mark Lee, Calvin J. Kuo, Charles Keller, Thomas A. Rando. Increased Wnt Signaling During Aging Alters Muscle Stem Cell Fate and Increases Fibrosis. *Science* 2007; 807-810.

25. Zhou L, Liu, Y. Wnt/β-catenin signaling and renin-angiotensin system in chronic kidney disease. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2016; 25(2): 100-106.

26. Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ortiz A. Klotho to treat kidney fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24:687-9.

27. Matsubara T, Miyaki A, Akazawa N, Choi Y, Tanahashi K, Kumagai H, et al. Aerobic exercise training increases plasma Klotho levels and reduces arterial stiffness in postmenopausal women. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2014; 348-355.

28. Cappelli K, Felicetti M, Capomaccio S, Pieramati C, Silvestrelli M, Verini-Supplizi A. Exercise-induced up-regulation of MMP-1 and IL-8 genes in endurance horses. *BMC physiology* 2009; 9-12.

29. Helge JW, Stallknecht B, Pedersen BK, Galbo H, Kiens B and Richter EA. The effect of graded exercise on IL-6 release and glucose uptake in human skeletal muscle. *J Physiol* 2003; 546: 299-305.
30. Steensberg A, Febbraio MA, Osada T, Schjerling P, Van Hall G, Saltin B , et al. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol.* 2001; 537: 633-639.
31. Tartibian B, Godrat-Garebagh Z, Gaeini A, Tolouei-Azar J. Influence of 9-Weeks Aerobic Exercise and Multivitamin Supplement on Inflammation Biomarkers as Cardiovascular Risk Factor in Non-athletic Obese Women. *ZJRMS* 2013; 15 (3): 30-35.
32. Boghrabadi V, Piri M, Sadeghi H, Sankian M. Effects of aerobic training on leptin, tumor necrosis factor-α and interleukin-6 levels in obese and lean men. *koomesh* 2009; 11(1): 33-40. (Full text in Persian).
33. Abedi B. The effects of 12-wk combined aerobic/resistance training on C-reactive protein (CRP) serum and interleukin-6 (IL-6) plasma in sedentary men. *yafte* 2012; 14(4): 95-106. (Full text in Persian).
34. Soltani F, Daryanoosh F, Salesi M, Mohamadi M, Jafari H, Soltani A. The Effect of Eight Weeks of Aerobic Exercises on Visfatin, IL-6 and TNF-α in Female Sprague Dawley Rats. *ZUMS Journal* 2013; 21(89): 30-39. (Full text in Persian).
35. Libardi CA, De Souza GV, Cavaglieri CR, Madruga VA, Chacon-Mikahil MP. Effect of resistance, endurance, and concurrent training on TNF-α, IL-6, and CRP. *Med Sci Sports Exerc* 2010; 44(1): 50-56.
36. Mogharnasi M, Gaeini A. Sheikholeslami V D Comparing the effects of two training methods of aerobic and anaerobic on some pre-inflammatory cytokines in adult male rats. *Iranian Journal of Endocrinology and Metabolism* 2010; 11; 191-198. (Full text in Persian).
37. Zhao Y, Banerjee S, Dey N, LeJeune W S, Sarkar P S, Brobey R, et al. Klotho Depletion Contributes to Increased Inflammation in Kidney of the db/db Mouse Model of Diabetes via RelA (Serine)536 Phosphorylation. *Diabetes* 2011; 60(7): 1907-1916.
38. Richard D. Semba, Luigi Ferrucci, Kai Sun, Eleanor Simonsick, Randi Turner, Iva Miljkovic, Tamara Harris, Ann V. Schwartz, Keiko Asao, Stephen Kritchevsky, Anne B. Newman, for the Health ABC Study; Low Plasma Klotho Concentrations and Decline of Knee Strength in Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2016; 71(1): 103-108.
39. Sagiv M, Sherve C, Ben-Sira D, Sagiv M, and Goldhamer E, Aerobic Training Effect on Blood S-Klotho Levels in Coronary Artery Disease Patients. *J Clin Exp Cardiolog* 2016; 7:8
40. Xia W, Zhang A, Jia Zh, Gu J, and Chen H. Klotho Contributes to Pravastatin Effect on Suppressing IL-6 Production in Endothelial Cells. *Mediators of Inflammation* 2016; 6.